

海洋性珪藻における葉緑体四重包膜機能解明のための測定法開発

著者	屋代 愛美
URL	http://hdl.handle.net/10236/00028951

海洋性珪藻における葉緑体四重包膜機能解明のための測定法開発

関西学院大学大学院理工学研究科
生命科学専攻 松田研究室 屋代 愛美

【研究目的】 緑色植物や紅藻は、真核従属栄養細胞がシアノバクテリアを取り込む一次共生によって葉緑体を獲得した。その後、紅藻や緑藻が別の従属真核生物に取り込まれる二次共生が起こった結果、多様な真核生物が葉緑体を獲得した。珪藻は、紅藻由来の葉緑体を持つ不等毛藻類に属し、四枚の膜に包まれた葉緑体を持つ。四重包膜のうち、内側二膜は葉緑体包膜 (chloroplast envelope : CEV) と呼ばれ、外側二膜は葉緑体 ER (chloroplast endoplasmic reticulum : CER) と呼ばれる。また、CER と CEV の間の空間はペリプラスチダル区画 (periplastidal compartment : PPC) と呼ばれる。海洋性珪藻は、海洋中の HCO_3^- を能動的に取り込み、葉緑体に供給することで高効率の光合成をおこなう。先行研究において海洋性珪藻 *Phaeodactylum tricornutum* では、細胞膜および葉緑体最外膜に solute carrier (SLC) 4 輸送体が存在し、 HCO_3^- を輸送していることが示されている。SLC は、 $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ の共輸送あるいは Na^+ 勾配を駆動力として $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ 交換輸送を行う二次輸送体であるが、葉緑体四重包膜に存在する SLC の二次輸送の仕組みは不明である。二次輸送が葉緑体包膜上で機能するためには、 Na^+ 、 Cl^- 、および H^+ などのイオン勾配を包膜間に形成することが必要であるが、この動的状態は全く調べられていない。本研究では、葉緑体四重包膜間のイオン濃度勾配を可視化する手法の確立を目的とする。

【実験方法】 haloYFP または pHluorin2 発現株の作製：細胞内の Cl^- 分布及び pH を明らかにするために、細胞質、PPC、葉緑体ストロマにハロゲンイオン感受性 YFP (haloYFP) および pH 感受性 GFP (pHluorin2) を発現させるコンストラクトを作製し、*P. tricornutum* に導入後、Zeocin による一次選抜を行った。細胞内の各蛍光タンパク質の局在確認：一次選抜後の細胞を共焦点レーザー顕微鏡によって観察した。蛍光分光光度計による haloYFP 発現株の蛍光強度の測定：haloYFP 発現株の測定では Cl^- を含まない培地で 120 分、その後 500 mM の NaCl または LiCl を添加し Cl^- 依存的な蛍光強度の変化を確認した。蛍光分光光度計による pHluorin2 発現株の蛍光強度の測定：pHluorin2 発現株の蛍光強度の測定では培地 (pH 8.2) に HCl または NaOH を添加して培地の pH を 9~5 に調節し、蛍光強度の測定を行った。その際 400 nm および 475 nm の二つの異なる波長で励起し、508 nm におけるそれぞれの蛍光強度比から pH 応答性を確認した。

【実験結果と考察】 細胞内の各蛍光タンパク質の局在確認：共焦点レーザー顕微鏡による観察により、導入した蛍光タンパク質が目的の区画に存在することが確認できた。蛍光分光光度計による haloYFP 発現株の蛍光強度の測定：細胞質 haloYFP 発現株の蛍光強度は、 Cl^- を含まない培地に懸濁後、時間経過に伴い徐々に増加したが、 Cl^- を添加後、蛍光強度は大きく減少した。この結果から、haloYFP の特徴であるハロゲン依存性蛍光減衰は、珪藻細胞内でも正しく機能することが確認できた。一方、PPC および葉緑体ストロマで haloYFP を発現している株では、細胞外 Cl^- 依存的な蛍光強度の変化は見られなかった。これらの結果から、PPC および葉緑体ストロマは細胞質による緩衝を受け、細胞外環境の影響を受けにくいことが考えられる。蛍光分光光度計による pHluorin2 発現株の蛍光強度の測定：細胞質または PPC で pHluorin2 を発現させた株において、HCl または NaOH の添加による培地の pH 変化 (pH 9~5) によって、励起光波長依存的な蛍光強度比が変化した。この結果から、珪藻細胞内で発現してい

る pHluorin2 での細胞内 pH の測定が可能であることが確認できた。これらの結果から両蛍光タンパク質によって細胞内の様々な区画においてイオンや水素イオン濃度を測定できる可能性が示された。